

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-026629

(43)Date of publication of application : 29.01.1992

(51)Int.Cl.

A61K 37/14
C07K 15/22

(21)Application number : 02-130313

(71)Applicant : RES INST FOR PROD DEV
NIPPON OIL & FATS CO LTD

(22)Date of filing : 22.05.1990

(72)Inventor : TSUCHIDA HIDETOSHI
HASEGAWA ETSUO
NISHIDE HIROYUKI

(54) PRODUCTION OF HEMOGLOBIN-CONTAINING MICROSOME

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain hemoglobin-containing microsome having excellent oxygen- carrying ability with a low metho-modifying fraction by making microsome of hemoglobin to endocyst of inside water phase in an atmosphere of carbon monoxide gas and non-cooling.

CONSTITUTION: A fixed amount of hemoglobin solution is added to powder of phospholipid, preferably glycerophospholipid having 14-20C (un)saturated fatty acid chain solely or mixed lipid of the phospholipid and cholesterol or fatty acid (preferably 12-20C) at 10-40°C, especially room temperature (15-30°C) in an atmosphere of carbon monoxide gas and non-cooling, and left in standing for 5min-3hr, preferably 10-30min to be hydrated, then is passed through membrane holes in a porous membrane with applying gas pressure of 1-30atm in an atmosphere of carbon monoxide to afford the aimed hemoglobin-containing microsome having desired granule diameter.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A) 平4-26629

⑤ Int. Cl.⁵A 61 K 37/14
C 07 K 15/22

識別記号

ABZ

庁内整理番号

8317-4C
7731-4H

⑬ 公開 平成4年(1992)1月29日

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全6頁)

⑭ 発明の名称 ヘモグロビン含有小胞体の製造法

⑯ 特 願 平2-130313

⑰ 出 願 平2(1990)5月22日

⑱ 発 明 者 土 田 英 俊 東京都練馬区関町南2丁目10番10号
 ⑱ 発 明 者 長 谷 川 悦 雄 埼玉県大宮市桜木町4丁目668番7号
 ⑱ 発 明 者 西 出 宏 之 東京都中野区鷺宮2丁目16番6号
 ⑲ 出 願 人 財団法人生産開発科学 京都府京都市左京区下鴨森本町15番地
 研究所
 ⑲ 出 願 人 日本油脂株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目10番1号
 ⑳ 代 理 人 弁理士 舟橋 榮子

明 細 書

1. 発明の名称

ヘモグロビン含有小胞体の製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) ヘモグロビン溶液と脂質からなるヘモグロビン含有小胞体を製造する際、一酸化炭素ガス雰囲気下で且つ非冷却下で操作することを特徴とするヘモグロビンのメト化を抑制したヘモグロビン含有小胞体の製造法。
- (2) 操作を10～40℃の温度で行うことを特徴とする請求項1記載の製造法。
- (3) 脂質がリン脂質単独あるいは、リン脂質とコレステロールもしくは脂肪酸とからなる混合脂質である請求項1または2記載の製造法。
- (4) リン脂質が炭素数14ないし20の飽和あるいは不飽和脂肪酸鎖を有するグリセロリン脂質である請求項3記載の製造法。
- (5) リン脂質が1, 2-ジ(オクタデカ-trans-2, trans-4-ジエノイル)-グリセロール-3-ホスホコリンである請求項3記載の製造法。

(6) 脂肪酸が炭素数12ないし20である請求項3記載の製造法。

(7) 脂肪酸がオクタデカ-trans-2, trans-4-ジエノ酸である請求項3記載の製造法。

(8) 不飽和脂肪酸がオクタデカ-trans-2, trans-4-ジエノ酸である請求項4記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、酸素運搬体として開発されつつあるヘモグロビン含有小胞体の製造法に関するものであり、医用分野あるいは工業分野で利用される。(従来の技術と発明が解決しようとする課題)

人あるいは哺乳動物(例えば牛など)のヘモグロビンを用い人工血液を合成し、医療に役立てようとする試みは古くから知られている。最近の試みとして例えば、ヘモグロビンを適当な架橋剤で架橋し高分子量の化合物を得たり、あるいは適当な水溶性高分子化合物(例えば、デキストランやポリオキシエチレンなど)をヘモグロビンに結合するなどの試みが行われている(バイオマテリア

ルズ・アーチフィシャル・セルズ・アーチフィシャル・オーガニズ、16巻、1～3号、1～703頁、1988年など）。

しかし、この種の試みで得られるいわゆる「修飾ヘモグロビン」の場合、人工血液の酸素溶解度を動物（特に人）の血液の値に調節することが困難なため、ヘモグロビン濃度が血液の半分以上にしか高められない。このため、該人工血液の酸素溶解度は血液の半以下であり、十分な酸素運搬機能がないのが現状である。この点を解決するため、新しい人工赤血球としてヘモグロビンを小胞体内水相に含有したいいわゆる「ヘモグロビン含有小胞体」が開発され、人工血液用酸素運搬体として注目されている（アービング・フランク・ミラーほか、特公昭60-26092号公報；シー・アンソニー・ハント、特公昭58-183625号公報；鈴木ほか、特公昭62-178521号公報）。

ヘモグロビンを小胞体内に内包する方法としては、大別して例えば次の方法が知られている。

①小胞体を構成する脂質を水和させた後、ある

いは脂質粉末を直接ヘモグロビン水溶液に加え水和、ストマッカーあるいはボルテックスミキサー等による混合、続いて該分散液に適当な圧力を加えノズル、多孔膜のような小孔（孔径：0.1 μmないし数μm）を通過させて製造する方法（水和／細孔通過法）。

②水と混合しにくい溶媒（トリクロロトリフルオロエタン、ジエチルエーテルなど）とヘモグロビン水溶液を混合したエマルジョンを製造後、減圧下で有機溶媒を留去して製造する方法（逆相蒸発法）。

しかし、②の方法では、使用した有機溶媒の完全な除去が困難なため、残留有機溶媒による毒性が実際の生体への使用に当たっては大きな問題となる。人工血液の安全性という観点からは、従来知られる製造法のうち①の方法がより好ましい。しかしながら従来の方法では、常温（15～30℃）で製造を行うと、ヘモグロビン蛋白質の変性やメト化（ヘモグロビンの補欠分子族であるプロトヘムの中心鉄が2価から3価に酸化され（メトヘモ

グロビンの生成（メト化））により酸素運搬機能を失う現象が起こりやすく、これを防止する工夫が必要であった。

そのために、製造操作を低温（～4℃）及び真空ガス下で実施せねばならなかった。従って、操作が極めて煩雑であった。また、特に細孔通過操作に多孔性薄膜（例えば、ポリカーボネート性多孔膜（米国、スクレオポアー・コーポレーション製））を用いる場合、カプセル化剤として用いる脂質成分の二分子膜の相転移温度以上の操作が、迅速かつ効率よい細孔通過に必要であり、相転移温度以下の温度（例えば、～4℃）でのヘモグロビン小胞体製造が容易でなかった。

本発明は、いずれにしてもこのような「ヘモグロビン含有小胞体」の製造、特にヘモグロビンの小胞体の内水相へのカプセル化（内包化）操作（水和操作過程、細孔操作過程など）を行う際の問題点を解決するため、非冷却下でヘモグロビンのメト化を抑制して酸素運搬機能のより高いヘモグロビン含有小胞体を製造するための新しい方法

を提供することを目的とする。

（課題を解決するための手段）

即ち、本発明は、ヘモグロビン溶液と脂質からなるヘモグロビン含有小胞体を製造する際、一酸化炭素ガス雰囲気下で且つ非冷却下で操作することを特徴とするヘモグロビンのメト化を抑制したヘモグロビン含有小胞体の製造法である。

特に本発明は、リン脂質、コレステロール、あるいは脂肪酸からなる小胞体の内水相にヘモグロビンを含有したいいわゆる「ヘモグロビン含有小胞体」の製造、さらに特にヘモグロビンのカプセル化（内包化）プロセスにおいて、その操作を一酸化炭素ガス雰囲気下で且つ非冷却下で行うことを特徴とする製造法である。

リン脂質は、飽和リン脂質、不飽和リン脂質のいずれでも構わない。例えば、卵黄レシチン、水添レシチン、ジミリスチルホスファチジルコリン、ジパルミチルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファ

チジルコリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリンシトールなどが利用できる。重合性基（例えば、エン（二重結合）、イン（三重結合）、ジエン、ジイン、スチレンなどの基）を有する重合性リン脂質（例えば、1, 2-ジ（オクタデカ-trans-2, trans-4-ジェノイル）ホスファチジルコリン、1, 2-ジ（オクタデカ-2, 4-ジェノイル）ホスファチジン酸、1, 2-ビスエレオステアロイルホスファチジルコリンなど）から選ばれる。

脂肪酸としては、炭素数12ないし20の飽和及び不飽和脂肪酸が用いられる。例えば、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、オクタデカ-2, 4-ジエン酸などである。

リボソームを構成する上記二分子膜に適当な添加剤（例えば、シアル酸、糖結合脂肪酸、ポリオキシエチレン結合リン脂質、ポリオキシエチレン結合脂肪酸など）が少量添加されても構わない。

7

一酸化炭素ガス雰囲気下で且つ非冷却下で行うことができる。

また、例えば以下のようにして行ってもよい。

リン脂質、コレステロールあるいは脂肪酸の混合物をバイレックスガラス製ナス形フラスコ中に秤量採取し、脱水ベンゼンあるいは脱水ベンゼンと無水メタノール（あるいはエタノール）の混合液（ベンゼン含量80体積%以上）を加え溶解（混合脂質濃度：1ないし10重量%）後、ドライアイス/メタノール浴で凍結する。これを高真空下で凍結乾燥し、混合脂質粉末を調製する。

これとは別に、ストローマを含まない精製ヘモグロビン水溶液（例えば、エル・ジョルジェビッチら、エクスパリメンタル・ヘマトロジー、8巻、584頁、1980年；ジー・エス・モスら、サージカル・ガイネクロジック・アンド・オブステトリックス、142巻、357頁、1976年；エー・エー・カチャトリアンら、プロブレムズ・ヘマトロジー、24巻、58頁、1979年；鈴木ら、人工臓器、17巻、708頁、1988年などの方法で調製）を、ヘモグロビン

精製ヘモグロビンは、既知の方法（日本生化学会編、続生化学実験講座8巻「血液」上、東京化学同人、1987年；Methods in Enzymology, Volume 76, 1981, Academic Press, New York; The Chromatograph of Hemoglobin, 1983, Dekker, New Yorkなど）を利用して製造することができる。

具体的なヘモグロビン含有小胞体の製造法としては、既知の水和/細孔通過法による製造法（例えば、ビー・ビー・ゲイバーら、FEB Sレター、153巻、285頁、1983年；ジェー・スツエベニら、バイオケミストリー、24巻、2827頁、1985年；鈴木ら、人工臓器、17巻、708頁、1988年；エル・ジョルジェビッチら、エクスパリメンタル・ヘマトロジー、8巻、584頁、1980年；ビー・ヨブスキーら、バイオキミ・バイオフィジ・アクタ、978巻、79頁、1989年；エム・シー・ファーマーら、メソツツ・イン・エンザイモロジー、149巻、184頁、1987年など）が適用でき、ヘモグロビンのカプセル化（内胞化）操作プロセスあるいはそれに付随するリボソーム粒径制御操作の際に、操作を

8

濃度5ないし45重量%、好ましくは15ないし35重量%に調整し、そのまま、あるいは一酸化炭素ガスで溶液を置換しておいたヘモグロビン溶液を準備しておく。

このヘモグロビン溶液の所定量を一酸化炭素ガス雰囲気下、非冷却のもとに10ないし50℃、好ましくは10~40℃、更に好ましくは室温（15ないし30℃）で、先に調製した混合脂質粉末に加える（この際、混合脂質を有するフラスコ内を予め一酸化炭素ガスで置換しておく）。一酸化炭素ガスの雰囲気下、非冷却状態で10ないし50℃、好ましくは10~40℃、更に好ましくは室温（15ないし30℃）で所定時間（5分ないし3時間（好ましくは10分ないし30分））静置（好ましくは遮光下で）し、水和させた後、一酸化炭素ガス（体積比は0.01以上）雰囲気下、1ないし150気圧（好ましくは1ないし30気圧）のガス圧を加えてポリカーボネート多孔膜の細孔を通過させ（例えば、孔径の大きい膜から小さい膜（例えば、孔径8, 5, 3, 2, 1, 0.6, 0.4, 0.2 μm）へと順次行ってゆくと保

9

10

作が容易である)、所望の粒径のヘモグロビン含有小胞体分散液を得る。

上記のようにして一酸化炭素ガス雰囲気下で調製したヘモグロビン含有小胞体のヘモグロビンのメト化率は、操作ガス雰囲気を空気、窒素ガス、あるいはアルゴンガス雰囲気で行う以外には全く同じ条件下で調製したヘモグロビン含有小胞体のメト化率に比べ、低く、従って酸素運搬能力が高い。

なお、既知の方法に従いヘモグロビンの酸素親和性制御剤(例えば、2, 3-ジホスホグリセリン酸、イノシトールヘキサリン酸、ピリドキサルリン酸など)を予め適量(例えばヘモグロビン1モルに対し、酸素親和性制御剤1モル程度)添加したヘモグロビン溶液、あるいは還元剤(還元型ニコチンアミドアデニンジスクレオチド(NADH)、アスコルビン酸、グルタチオンなど)をヘモグロビンサブユニットに対し5ないし50モル%添加したヘモグロビン水溶液を原料として用いると、メト化がより抑制されるので好ましい。

11

の簡易化、コストの低減化を図ることができる。
(実施例)

以下、実施例に基づき本発明を具体的に説明する。

実施例1

10mlナスフラスコの中にイノシトール6リン酸(IHP)を等モル含んだ精製ヘモグロビン水溶液(17g/dl、メト化率2.6%)6mlを加え、一酸化炭素ガスを十分吹き込む。これにガラスビーズ(粒径1ないし2mm)1mlを加え、次いで、混合脂質粉末(1, 2-ジ(オクタデカ-trans-2, trans-4-ジエノイル)-sn-グリセロール-3-ホスホコリン(DODPC)/コレステロール(chol)/オクタデカ-trans-2, trans-4-ジエノ酸(ODA)(モル比: 7/1/2)を予め乾燥ベンゼンから凍結乾燥処理したもの)300mgを加え密封した。室温下で15分間水和させ、その後、15分間ボルテックスミキサー(御井内盛栄堂製、MA-1型)で攪拌処理を行った。その後エクストルーダー(登録商標、リベックス・バイオメンブランズ・インコ

13

一酸化炭素ガスの除去は、次のようにして行えばよい。例えば、得られたヘモグロビン含有小胞体分散水溶液を4℃(例えば氷浴中)で冷却しながら、白色光を照射しながら酸素ガスあるいは空気を溶液内に所定時間吹き込むことにより、一酸化炭素ガスを除去出来る。この例を参考例1に示した。この確認は可視吸収スペクトルのヘモグロビンに基づく特性吸収帯(ソーレ帯、Q帯)から容易に確認できる(参考文献: イー・アントニーニラ、ヘモグロビン・アンド・ミオグロビン・イン・ゼア・リアクションズ・ウィズ・リガンド、ノースホランド・パブリッシング・カンパニー、1971年ほか)。

(発明の効果)

本発明の製造法により、ヘモグロビン小胞体の製造において従来困難とされてきた製造時のヘモグロビンのメト化を非冷却においても抑制し、メト化率の低いヘモグロビンを含有する「ヘモグロビン含有小胞体」を製造するとともに、非冷却下での製造操作を可能とすることで、製造プロセス

12

ーボレイション、カナダ)装置を用い、所定温度下、一酸化炭素ガス加圧下(〜3kg/cm²)で、上記ヘモグロビン/脂質懸濁液をポリカーボネート膜(スクレオポアー・コーボレイション、米国)に孔径: 8, 5, 3, 2μmの順で通過させて処理した。エクストルーダー処理操作は2時間行った。

こうして得られたリボソーム分散液5mlを5mM Tris緩衝水(pH 7.4)で置換したセファロースゲルカラム(半径3cm、長さ15cm)で分画し、遊離のヘモグロビンを除去し、ヘモグロビン含有リボソーム分画を集めた。得られたヘモグロビン含有リボソームのメト化率は松原らの方法(蛋白質、核酸、酵素、32巻、671頁、1987年)により定量した。結果を表1に示す。

操作を一酸化炭素ガス雰囲気下で実施することにより、30℃、20℃、4℃のいずれにおいてもメト化率の増加を抑制出来ることが明らかである。

また、同様な操作を3mMの還元型ニコチンアミドアデニンジスクレオチド(NADH)を製造操作直前に添加し溶解したヘモグロビン溶液を用い

14

て実施し、ヘモグロビン含有小胞体を製造し、メト化率を測定した。結果を表1に併せて示す。その効果は原料ヘモグロビン水溶液に予めNADHを添加しておくことで増強された。

参考例1

5 mlナスフラスコに実施例1で調製したヘモグロビン含有小胞体-CO錯体を約4 cc入れ、60W白色灯を照射しながら、氷冷下で約2時間O₂をバブルすることにより、O₂錯体が得られた。一酸化炭素の除去の確認は紫外可視分光光度計(島津製作所、HSP-2000型)を用い、ヘモグロビン由来のソーレ帯およびQ帯の特性吸収帯吸収極大波長(λ_{max})を測定、一酸化炭素錯体(540, 569, 419nm)から酸素錯体(オキシヘモグロビン: 541, 576, 415nm)への変化により行った。

実施例2

ポリ袋中に精製ヘモグロビン水溶液(17g/dl、メト化率2.5%)5 mlを加え、一酸化炭素ガスを十分に吹き込む。これに混合脂質粉末(1, 2-ジ(オクタデカ-trans-2, trans-4-ジエノイル)-

sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DODPC)/コレステロール(chol)/オクタデカ-trans-2, trans-4-ジエン酸(ODA)(モル比: 1/1/2)を予め乾燥ベンゼンから凍結乾燥処理したもの)250 mgを加え密封後、20℃および30℃で15分間水とさせた(ステップ1)。

次いでストマッカー(Seward社、ストマッカー80)を用い20℃および30℃で15分間処理を行った。(ステップ2)。

各段階におけるヘモグロビンのメト化率を血液ガス分析装置(Instrumentation Laboratory、アイエルメーターILBGM1312)で測定した。結果を表2に示す。

操作を一酸化炭素ガス雰囲気下で実施することにより、ヘモグロビンメト化率の増加を抑制出来ることが明らかである。

実施例3

実施例2において混合脂質粉末として、1, 2-ジ(オクタデカ-trans-2, trans-4-ジエノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DODPC)

15

ノコレステロール(chol)/オクタデカ-trans-2, trans-4-ジエン酸(ODA)に代えて、水添レシチン/コレステロール/パルミチン酸(モル比: 1/1/2)250 mgを用い、温度を20℃にした以外は、全く同様の方法でヘモグロビン小胞体を製造し、各ステップにおけるヘモグロビンメト化率を測定した。結果を表3に示す。

操作を一酸化炭素ガス雰囲気下で実施することにより、ヘモグロビンメト化率の増加を抑制出来ることが明らかである。

16

表1 ヘモグロビン含有小胞体の製造前後におけるヘモグロビンメト化率の変化

操作ガス雰囲気	メト化率の増加量(%)		
	操作温度4℃	操作温度20℃	操作温度30℃
酸素	+3.6(+1.0)	+11.0(+4.0)	+15.0(+5.5)
一酸化炭素	+2.5(-2.0)	+3.0(+0.3)	+3.2(+0.5)

a) メト化率の増加量 = (原料ヘモグロビンのメト化率) - (ヘモグロビン小胞体のメト化率)

b) 括弧内の値は3mM NADHをヘモグロビン水溶液に添加した場合。

17

18

表 2 ヘモグロビン含有リボソームの製造前後における
ヘモグロビンメト化率の変化

操作雰囲気	操作温度 (℃)	メト化率 (%)		
		原料ヘモグロビン	ステップ 1	ステップ 2
一酸化炭素ガス	20	2.6	4.6	6.2
窒素	20	2.6	10.6	21.4
一酸化炭素ガス	30	2.6	6.2	7.5
窒素	30	2.6	15.6	27.4

19

表 3 ヘモグロビン含有リボソームの製造前後における
ヘモグロビンメト化率の変化

操作雰囲気	操作温度 (℃)	メト化率 (%)		
		原料ヘモグロビン	ステップ 1	ステップ 2
一酸化炭素ガス	20	2.6	4.4	6.0
窒素	20	2.6	20.8	22.0

20